

Volatile isoThiocyanate の比色定量法における

揮発性不純物による吸収妨害に関する吟味

箕口 重義 恩田 令子 福沢美喜男

Studies on the Determination of isoThiocyanate in Plant Materials III

A Critical study on the nonspecific absorption

due to unknown volatile byproducts in

spectrophotometric determination of

volatile isothiocyanate

by SHIGEYOSHI MIGUCHI, REIKO ONDA

and MIKIO FUKUZAWA

緒 言

アブラナ科植物はじめ各種の植物材料に広く分布している各種 volatile isothiocyanate の定量には銀滴定法が最も基本的な定量法として知られているが長島等(1957)⁴⁾はワサビの辛味成分 (Allyle isothiocyanate) の定量に比色法を用いており、それ以前に Kjer 等(1953)²⁾も各種の volatile isothiocyanate の定量に適用できる比色法を提案している。

両法とも原理は volatile isothiocyanate から誘導されたチオ尿素 (N-Substituted thiourea) の紫外部の吸収特性を利用した比色定量法であり微量定量に適した方法ではあるが、これらの方法を実施する際、酵素加水分解後の水蒸気蒸溜の際に混入する揮発性妨害物質の有無、多少がこれら定量法の死命を制するものと考えられ

るのでワサビ地下茎、和ガラシ粉、ナタネ種実などを用いて比色法と揮発性妨害物質との関係を再吟味した。

材料と方法

1. 試料とその調製法

(1) ワサビ ワサビ (*EuTrema Wasabi* Maximowicz) の生鮮地下茎部を葉柄、根などを除去し 25 倍量の冷アセトン (4℃以下に冷却) 中に 5mm の厚さに切り落とし、冷凍庫内で 24 時間脱水し、とり出して粉碎した後さらにアセトン処理をくりかえした後、乳鉢で細粉状に粉碎したものを供試料とした。

(2) カラシ カラシナ (*Brassica juncea* Cosson) の種子より脱脂調製され、自家ミロシナーゼ活力が充分高いことを確認した和ガラシ粉 (飯野香辛料 K K) をそのまま試料とした。

(3) ナタネ 搾油原料として広く用いられている2種のナタネ *Brassica napus* L. の種子(青森44年度産, 品種不詳)及び *B. Campestris* L. の種子(カナダ44年, 品種不詳)をワサビの場合に準じ冷アセトンで脱脂粉碎したもの。

なお以上(1)~(3)の試料は自家ミロシナーゼの高い活力が保持されていることをたしかめた。

2. Volatile isothiocyanateの定量

比色法による測定結果の比較の基準となる。volatile isothiocyanate の定量法は銀滴定によるものとし、蒸溜滴定等はWetter (1955)⁵⁾の方法に準じた。ただし試料の酵素加水分解は pH 5.5のリン酸緩衝液 2倍稀釈液 50倍量を加え37℃, 3時間おこなった。特に本実験では粗酵素剤に由来する揮発性妨害物質の混入をさけるためすべて自家ミロシナーゼを利用する方法をとり蒸溜受器に予め硝酸銀を加える点も試料の1半を比色定量に供用するので改めた。

3. 比 色

試料溶液の紫外部の吸収スペクトルの測定、比色は水を溶媒とし、液層10mmの角槽を用い、分光光度計は島津 UV-50型を使用した。

実験結果と考察

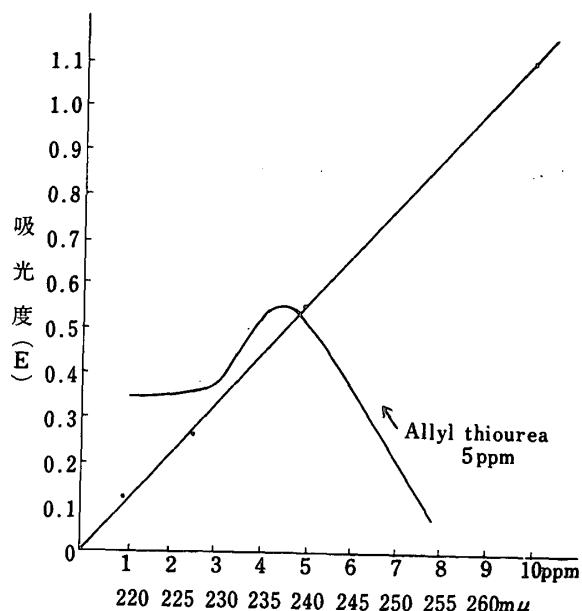
1. Allyl thioureaの紫外部吸収スペクトルと検量線

合成allyl isothiocyanate に10%アンモニア水を加えて反応させ純エタノールallyl thioureaを生成させ、反応液をエバポレーターで蒸発乾固(50℃以下)した後、純エタノールにとかし再結晶を2回くりかえしたものを標品とし、紫外部の吸収スペクトルを測定した結果は1図の如くであり、長島等の場合と同様に237~238 mμ付近に極大の吸収を示す曲線が得られた。さらに237mμの波長を用いて液層1cmで検量線を作成したところ原点を通る直線で1 ppm以下の水準でもthioureaの検出ができることが確認された。

なお検量線を長島等のE関係式 $E_{237m\mu} \times 0.9435 = \text{mg}/100\text{cc allylthiourea}$ と比較する

と $E_{237m\mu} \times 0.9425 = \text{mg}/100\text{cc allyl thiourea}$ となり長島等の場合はアルモニア, エタノール各2%を含む溶媒で本実験では純水溶媒としたのであるが比較的よく合致することをたしかめた。

第1図 Allyl thioureaの吸収曲線と検量線

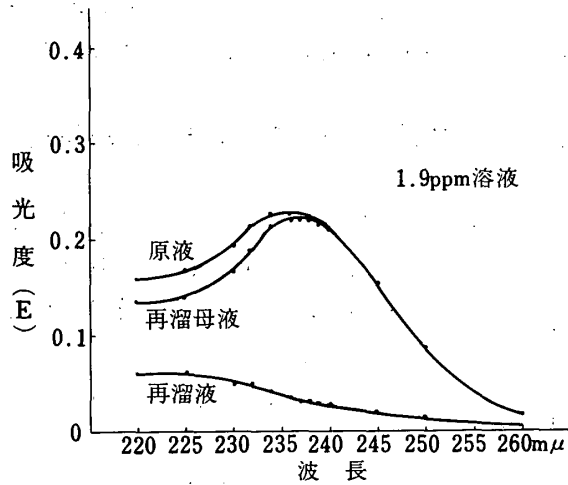


2. 水蒸気蒸溜の溜出液と紫外部吸収スペクトル

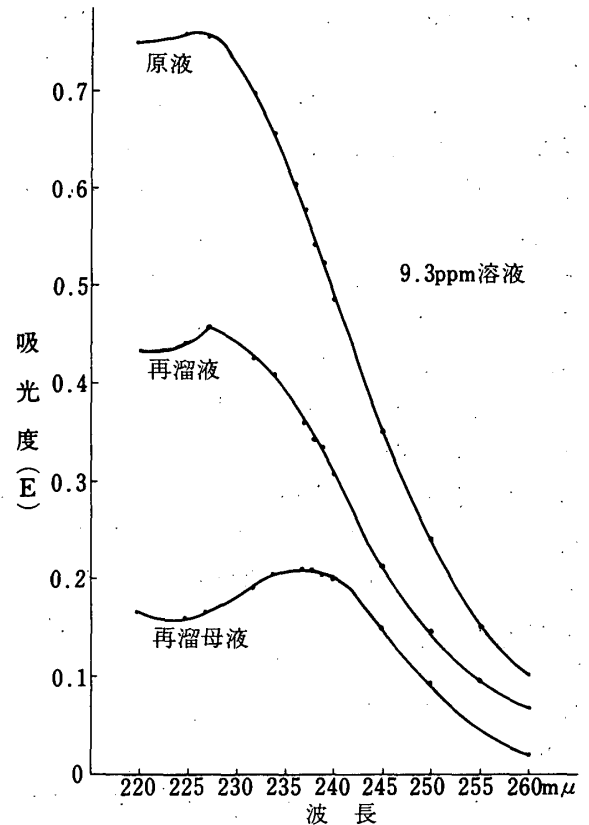
各試料の酵素加水分解物は水蒸気蒸溜して、volatile isothiocyanate をアンモニアとエタノール混液に導いてthioureaに誘導したのであるが溜出液(それぞれ約400ml)は一夜静置してthioureaの生成を完了させた後500mlに定容し1半を銀滴定に供し、1半を比色に用いた。比色においてはthioureaはisothiocyanateと異り比較的安定で不揮発性である点を利用し、溜出原液を再び水蒸気蒸溜に付し(1時間)母液にはthioureaが残し揮発性比色妨害物質を溜出させて分離することを試みた。吸収スペクトルは原液、再溜液、母液について同一稀釈水準になる様定容して測定した。

(1) ワサビ アセトン処理試料約2gづつを用い測定した結果は第2図の如くであり、ワサビの場合は溜出原液でも237mμを極大値を示すきれいな曲線をえがき、再蒸溜後の母液の吸収スペクトルは僅かにシャープになるだけでほと

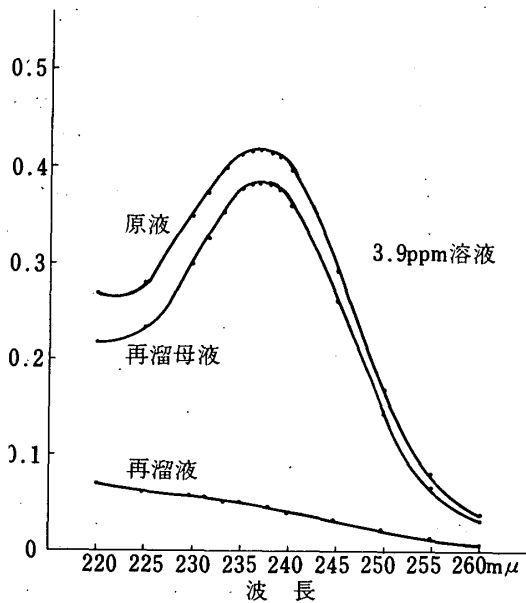
第2図 紫外外部吸収曲線(ワサビ地下茎)



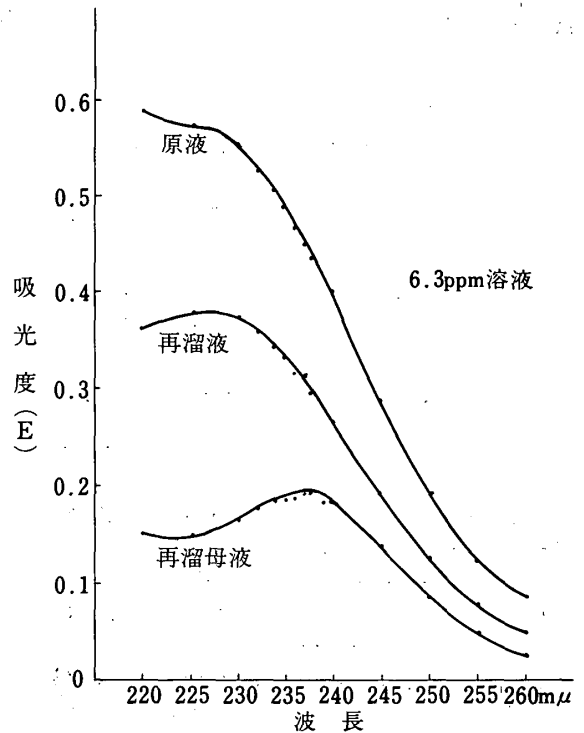
第4図 紫外外部吸収曲線(*B.napus* 種子)



第3図 紫外外部吸収曲線(カラシ粉)



第5図 紫外外部吸収曲線(*B. campestris* 種子)



んど差がなく、再溜液の吸収スペクトル、即ち thiourea 以外の揮発性不純物に基づく吸収は 220 ~ 260mμ の間ほぼ直線性を示し低い値を示した。

(2) カラシ ワサビと同様辛味の主成分が、allyl isothiocyanate である和ガラシ粉について実施した結果は第3図の如くであり、ワサビの場合と全く同じ傾向を示し、揮発性不純物に基づく吸収スペクトルも 220~260mμ の間で略直線状であることも同様であった。

(3) ナタネ *B. napus* 及び *B. campestris* 種実中のvolatile isothiocyanateは 3-butenyl isothiocyanateであるがKjer (1972)は allyl-3-butenyl-を含む大部分のvolatile isothiocyanateの2%エタノール溶液の紫外部吸収の極大値を示す波長は $237 \pm 1 \text{ m}\mu$ の範囲に収まることを観察しており、本研究の場合も再蒸溜母液の吸収スペクトルはワサビ、カラシの場合と同じく $237 \text{ m}\mu$ 付近に極大値のある曲線を示しているがワサビ、カラシなどと著しく異なる点は再溜液の各波長の吸光度は母液のそれより著しく高い水準にあり、さらに $232 \sim 234 \text{ m}\mu$ 付近にピークのある曲線をし、ワサビ、カラシの場合のように $220 \text{ m}\mu$ から $260 \text{ m}\mu$ に向って直線的な傾斜を示すこともない。そして原液の吸収スペクトルではthioureaに基く $237 \text{ m}\mu$ 付近の吸収は未知の妨害物質に完全に覆われ $220 \sim 225 \text{ m}\mu$ の長波長側に起伏のない傾斜を示しているにすぎず原液のままでは比色法が全く適用できないことが明かである。

3. 比色法による測定値と銀滴定による測定値の比較

前述の如くナタネ種実類の様に水蒸気蒸溜溜出物に多量の比色妨害物質を含むものもthioureaの不揮発性を利用して再蒸溜によって妨害物質を除去することが可能であったので再蒸溜、(水蒸気蒸溜)によって揮発性妨害物質を除去した、後の母液を用いて3種の比色法により計

算し、銀滴定による実測値と比較吟味した。

(第1表)

(1) 長島等の比色法 生鮮ワサビ根茎 S g 中のvolatile isothiocyanateのmg数Aは次式で与えられる。

$$A = (E_{237\text{m}\mu} - 0.0125S) \times 5 \times 0.9435 \times 0.8534$$

この方法は $E_{237\text{m}\mu}$ から妨害物質に起因する吸光度(生鮮物 1 g 当たり $E_{237\text{m}\mu} 0.0125$)を差引いたものをthioureaによる真の吸収として算定する方法である。ただし、

$$0.8534 = \frac{\text{allyl isothiocyanate の分子量}}{\text{allyl thiourea の分子量}}$$

$$E_{327\text{m}\mu} \times 0.9435 = 1 \text{ mg}/100\text{cc}$$

allyl thiourea (本研究の実測値 0.9425)

本研究の再蒸溜母液に適用する場合は揮発性不純物は含まれないものとして $A = (E_{237\text{m}\mu}) \times 5 \times 0.9425 \times 0.8534$ として算出した場合と比較すると第1表の如くほとんど差がなかった。さらに比色法と銀滴定の結果も比較的よく一致し、長島等の主張のように銀滴定はthiourea以外な値を示すことを考慮にいれば長島等の方法及び筆者等の変法でもワサビのvolatile isothiocyanateの定量には充分利用できる比色法であると認められた。

カラシ粉の場合はワサビ同様volatile isothiocyanateの大部分はallyl isothiocyanateであることが知られており、本研究での吸収スペク

第1表 銀滴定法と比色法による検出値の比較

要 項 試料の種類		試料の採取量 (g)	Volatile isothiocyanateの検出値						
			銀滴定法 実測値 (mg) 原液	比 色 法					
				長島等 (1957)		Kjer等 (1953)		Kjer法 改変法	
				計測値 (mg)	対銀滴定 百分比	計測値 (mg)	対銀滴定 百分比	計測値 (mg)	対銀滴定 百分比
ワサビ 地下茎	再溜母液	6.1566	18.85	17.43	92.46	16.70	88.59	16.69	88.54
	原液			17.42	92.41	16.90	89.66	15.37	81.54
カラシ粉母液		2.0012	24.42	19.35	79.24	18.94	77.56	18.97	77.68
ナタネ 種子	<i>B. napus</i>	5.0026	7.84	1.92	24.49	1.45	18.49	1.29	16.45
	<i>B. campestris</i>	5.0020	10.25	2.09	20.39	1.73	16.88	1.66	16.20

トルともワサビの場合とよく類似しているが、揮発性不純物が多く銀滴定の結果との喰い違いにも多きく、約80%程度の値を示した。

ナタネの場合は揮発性妨害物質の極めて大量に存在することは少ない値が得られることは予想されたが予備通り銀滴当の20~24%にすぎなかった。

(2) Kjer法及びその変法による算出

Kjer等(1953)は各種植物材料に分布する主なvolatile isothiocyanate即ちmetlryl, allyl, isopropyl, sec.-butyl, 3-butenyl, benzyl, 及び β phenylethyl isothiocyanateなどから誘導されるthioureaの純エタノールを溶媒とした比色定量の算式として

$$e_{240m\mu} = (E_{240m\mu} - \frac{E_{220m\mu} + E_{260m\mu}}{2})K$$

但し $E_{240m\mu}$, $E_{220m\mu}$, $E_{260m\mu}$ はそれぞれ波長における吸光度の測定値, K はthioureaの種類によって異なる係数であり, ここではAllyl thioureaの1.45を適用(ナタネ類の場合は3-butenyl thioureaがallyl thioureaより多いとさされているが K 値は大差なく1.45という数値は各種thioureaの平均値に近い) $e_{240m\mu}$ は妨害物質の影響を除いたthioureaのみによる真の吸光度。

筆者等の変法はKjer等の原法を $237m\mu$ をピークにしたものに変形したものを用いた。

$$e_{237m\mu} = (E_{237m\mu} - \frac{E_{220m\mu} + E_{257m\mu}}{2})K$$

$K = 1.735$ (第1図のAllyl thioureaの吸収スペクトルにより算出)

結果は第1表の通りであり一般に長島等の方法と全く同じ傾向の数値を示したが算定値はより低目の値を示し, 原法と筆者等の変法との計算値に差はみられなかった。

以上の結果から一般に本研究の方法で比色妨害物質を除去して比色法で測定した場合は材料によって結果が著しく異なり妨害物質の多いものほど銀滴定の結果と喰い違う数値を得ており長島等の方法は妨害物質の極めて少ないワサビには適用できるがその他の材料には適用できない方法であることが明かである。

また筆者等の再蒸溜による妨害物質除去に有効であり, ワサビで原液と再蒸溜母液での測定値が一致する点から, 再蒸溜によるthioureaの破壊損失もないことが推定され, したがって再蒸溜液を用いれば比色法が可能と思われるが, Kjer等は原液を減圧蒸発乾固し純エタノールでthioureaを抽出する精製法をとっているが, これらの方法の優劣を比較し, さらに銀滴定との喰い違いの原因を明かにする必要がある。

但し従来volatile isothiocyanateの測定に銀滴定が基本的な測定法とされていたのは水蒸気蒸溜の溜出物にはisothiocyanate以外に硝酸銀消費物質は極めて僅少であるとの前提にたっているのであるがVan Etten等(1966)はナタネ種実による研究で酵素加水分解の条件や種子の貯蔵条件などで生成物の種類や比率に差があり定型的な反応だけでないことを述べており, thioglucosideの加水分解物もisothiocyanate以外の物質(たとえばシアノ化合物)などが生成する過程も考える必要があり, アンモニア性硝酸銀消費物中のisothiureaとそれ以外の物質との内訳を明かにする必要がある。

摘 要

ワサビ地下茎, カラシ粉, ナタネ種子などを材料としvolatile isothiocyanateの比色定量法における紫外部吸収妨害物質の分離法を工夫し妨害物質の多少を比較し, 銀滴定法の定量値と比色法による測定値との関係を検討した。

1. Volatile isothiocyanateをthioureaに転化させた後の水蒸気蒸溜溜出物を再蒸溜(水蒸気蒸溜, 1時間)する方法はthioureaの損失もなく紫外部吸収妨害物質の除去に有効である。

2. 試料の種類により妨害物質の含量は著しい差があり, ワサビ地下茎は極めて少なく, カラシ粉はこれにつぎ, ナタネ種子は*B. napus*, *B. campestris*とも著しく多い。

3. 銀滴定法の測定値に対し, 再蒸溜母液を用いた比色定量値を比較すると百分比は妨害物質の多少相関があり, ワサビは両法が比較的よく一致するがカラシ粉, ナタネ種子の順に比色

定量法による測定値が大巾に低くなっている。 比色する長島等の方法が適用できるが、本法は
4. ワサビ地下茎では水蒸気蒸溜出物原液を ワサビ以外には適用できない。

文 献

- | | |
|--|--|
| 1) Van Etten, C. H., Daxenbichler, M. E., Peters, J. E. and Tookey, H. L. : J. Agr. Food chem., 14 427 (1966). | 3) Kjer, A. Zahradnic, R., Dusec, K. and Klaban, J : Acta Chem. Scand., 16, 2041 (1972). |
| 2) Kjer. A. Conti, J, and Larsem, I. : Acta Chem. Scand., 7, 1276 (1953). | 4) 長島善次, 中川致之 : 農化, 31, 416(1957). |
| | 5) Wetter, L. R. : Candian J. Biochem Physiol., 33, 980 (1955). |